

Proteomic analysis of gamma-irradiated human leukemic cells

Disertační práce Mgr. Šalovské byla vypracována v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie pod vedením prof. M. Řezáčové a konzultanta doc. Aleše Tichého.

Po formální stránce má práce víceméně tradiční strukturu. Je napsána jako standardní vědecký text s odpovídajícím členěním a je doplněna o přílohy souvisejících publikací ve vědeckých časopisech. Spis je napsán v anglickém jazyce. Pokud mohu posoudit jako nerodilý mluvčí, je jazyková úroveň textu velmi vysoká a pokud jsem prováděl nějaké opravy a glosování tužkou, netýkalo se to srozumitelnosti. V seznamu citované literatury je více než 400 položek, což je samozřejmě úctyhodné číslo, nicméně si myslím, že tak rozsáhlé citování původní literatury nebylo nutné a osobně bych volil menší objem a to i z toho důvodu, že disertační práce nemusí být vyčerpávající a detailní kompilací dostupných informací, ale má v tomto ohledu ukázat především syntézu a výtah esenciálních vědomostí. Přílohové články (2 x přehledný článek, 2 x originální článek) jsou vesměs v časopisech s impaktivním faktorem a Barbora Šalovská je třikrát prvním autorem a jednou autorem druhým.

Abstrakt je zdařilým představením smyslu experimentální činnosti a hlavních výsledků. V úvodní kapitole jsou dvě tematické části, první je věnována problematice poškození DNA vlivem ionizujícího záření a buněčné odezvě, kde se uplatňují regulační mechanismy závislé mj. na činnosti kinas, enzymů, které se podílejí na reverzibilní fosforylaci svých proteinových substrátů, což jsou často další důležité enzymy v regulační kaskádě. Fosforylace patří mezi ty postranslační modifikace proteinů, jejichž zkoumání v laboratořích je věnován pro jejich význam a důležitost velký prostor. V souladu se zaměřením této disertace, je druhá část úvodní kapitoly věnována roli proteinové fosforylace u eukaryotních buněk, typům fosforylace a souvislostem analýz fosfoproteinů a fosfopeptidů, kde se autorka soustředila na záležitosti obohacení, tedy získání příslušné frakce z komplexních vzorků, dále na chromatografické metody ve fosfoproteomice (iontoměniče, HILIC, TiO₂/ZrO₂ aj.) a následně na hmotnostní spektrometrii fosfopeptidů a metody kvantifikace pomocí hmotnostní spektrometrie se zhodnocením výhod a nevýhod používaných postupů a strategií. Na úvodní část potom navazuje představení cílů práce, seznam použitého materiálu a přístrojů a vyčerpávající přehled metodických postupů. Pokud mám tuto pasáž podanou zhruba na polovině rozsahu celé disertační práce hodnotit, musím v první řadě vyzdvihnout vysokou úroveň zpracování, a to jak z pohledu logické konstrukce textu, tak pokud jde o uváděná fakta. Myslím si však, že dojem by byl ještě lepší, pokud by tento text nebyl tolik hutný a nepestrý. Narážím na to, že jsou uvedeny pouhé tři obrázky a přitom třeba v kapitole o proteinové fosforylaci se možnosti zařazení obrázků, schémat a tabulek přímo nabízejí a obrázek jak známo „dá za tisíc slov“. Specifická připomínka se týká používání pojmů metoda a technika, které je např. na str. 33 uváděno jako synonymní, což není správné. Bylo by proto dobré u obhajoby krátce zmínit, jaký je význam těchto pojmů a proč by správně neměly být zaměňovány.

Experimentální výsledky jsou zpracovány ve dvou kapitolách, na což je čtenář upozorněn v předmluvě. Kapitola Results podává stručný přehled v logické návaznosti, tedy v první řadě se zmiňuje optimalizace metodiky pro purifikaci/obohacení, separaci a MALDI hmotnostní spektrometrie fosfopeptidů. Následuje popis experimentů s ozařovanou leukemickou buněčnou linií MOLT-4, kinasovými inhibitory a kvantifikací SILAC. Klíčové experimenty přinesly posouzení změn na úrovni proteomu, fosfoproteomu a metabolomu pro MOLT-4 buňky a inhibitor VE-821. V kapitole Discussion jsou výsledky detailně a fundovaně diskutovány v jednotlivých tematických blocích a obě

zmíněné části jsou v celkovém srovnání poměrně bohatě doprovázeny grafikou, avšak mnohé obrázky jsou velmi špatně čitelné, což platí zejména o obr. 24-27 (výsledky metabolomické studie), ale třeba i obr. 7-8, kde měl být zvolen jiný formát, jelikož vlastně nebylo nutné na daný omezený prostor vměstnat vyčerpávající grafickou informaci. Naproti tomu, kupříkladu obr. 14 je vzornou ukázkou toho, že je možné se s problémem místo vs. objemná informace výborně vypořádat. Pro reprezentativní obrázek s vybranou záležitostí (např. 2-3 hmotnostní spektra) mohla být třeba přidána doplňující tabulka. Tabulky obecně v celé disertaci postrádám. Tato skutečnost se z mého pohledu negativně odráží zejména v orientaci v textu diskuse na str. 126-134, kde se objevuje v podstatě kontinuální výpis jmen proteinů s ovlivněnou fosforylací vždy se stručným zhodnocením, kde problikávají čísla fosforylovaných aminokyselinových zbytků. Jelikož detailně neznám problematiku kinasové regulace a specifčnosti kinas, ztrácím se bohužel po přečtení několika vět. Pohled do shrnující tabulky by býval byl úlevou. Abych jen nekritizoval, závěrečné shrnutí dosažených výsledků je výborné a čtivé.

Dotazy k výsledkům a diskusi:

1) *V experimentální části byla sledována indukce apoptózy, viabilita buněk a perturbace buněčného cyklu průtokovou cytometrií vlivem ionizujícího záření v přítomnosti kinasových inhibitorů. Protože se ale téma prostřednictvím studovaných kinas dotýká procesů oprav DNA, zajímalo by mě, zda bylo sledováno i samotné poškození DNA, např. fluorescenčním barvením nebo kometovou analýzou. Pokud ne, jaké jsou znalosti o rozsahu poškození vlivem používané dávky ionizujícího záření. Jaké to v datovém souboru bylo se změnami fosforylace histonů u MOLT-4 buněk?*

2) *Metabolomická analýza MOLT-4 linie ukazuje, že ozáření v senzitivizovaných buňkách vede k širokému ovlivnění, neboť je zasažena řada drah, ať už se jedná o energetický metabolismus, respiraci, metabolismus sacharidů, aminokyselin, lipidů či nukleotidů. Mám načtenou (nikoli praktickou) zkušenost, že takové změny se ve studiích na nádorových buňkách objevují obecně a typicky se zaznamenává Warburgův efekt s poškozením mitochondrií (= respirace) a nárůstem glykolýzy. Můj dotaz směřuje k tomu, do jaké míry jsou tyto výsledky relevantní pro daný experimentální model specificky ošetřené buněčné linie a jak přesvědčivé může být extrahování informace z komplexních dat, když lze za vším vidět dramatický zásah do celé buněčné regulace, která zákonitě musí mít v buňkách velký dopad na klíčové dráhy metabolismu.*

Závěrem posudku je konstatování, že autorka zvládla práci s odbornou literaturou, samostatné plánování a provádění laboratorních experimentů, včetně jejich vyhodnocení a diskutování. Prokázala tvůrčí vědecké schopnosti v dané oblasti experimentálního výzkumu a její práce splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce v oblasti lékařské chemie a biochemie. Z tohoto přesvědčení vyplývá i moje jednoznačné doporučení k obhajobě disertační práce před odbornou komisí.

V Olomouci dne 15. 3. 2017

Prof. Marek ŠEBELA